



КОНЬЮГАТЫ АМИНОПЕНИЦИЛЛИНОВ С БЕЛКАМИ: СИНТЕЗ, ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА, СВЯЗЫВАНИЕ С РЕЦЕПТОРОМ БЕТА-ЛАКТАМОВ И АНТИТЕЛАМИ

© 2022 г. О. С. Куприенко*, #, Т. С. Серченя*, И. И. Вашкевич*, И. В. Горбачева*, А. И. Зильберман*, О. В. Свиридов*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.

После доработки 29.06.2021 г.

Принята к публикации 11.07.2021 г.

Предложен новый подход к модификации аминопенициллинов и получению их конъюгатов с белками с использованием ди-*N*-гидроксисукцинимидных эфиров дикарбоновых кислот в качестве кросс-линкеров. Ацилирование ампициллина (Amp) и амоксициллина (Amox) ди-*N*-гидроксисукцинимидными эфирами адипиновой или терефталевой кислоты проводили в диметилформамиде. Последующее конъюгирование полученных производных аминопенициллинов с белками протекало в водной среде при pH 8.3, в результате чего синтезированы иммуногенные и ферментные конъюгаты Amp и Amox. Показано, что в результате химических модификаций Amp и в ходе синтеза линкерных конъюгатов не происходит разрушение бета-лактамного цикла антибиотика. В ходе длительной иммунизации кроликов иммуногенным конъюгатом Amp с тироглобулином, содержащим ароматический линкер, получены поликлональные антитела, способные с очень высокой чувствительностью связывать Amp, Amox и пенициллин G. Конъюгаты аминопенициллинов с пероксидазой из корней хрена охарактеризованы в конкурентном белок-связывающем (рецепторном) анализе, а также в системе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Из исследованных модельных иммуноаналитических систем наилучшими характеристиками в отношении определения Amp обладала система гетерологичного прямого ELISA с использованием полученных поликлональных антител и синтезированного конъюгата Amp с пероксидазой, в котором в качестве линкера использован фрагмент адипиновой кислоты: аналитическая чувствительность составила 0.03 нг/мл, IC₅₀ = 0.20 нг/мл.

Ключевые слова: пенициллины, бета-лактамы антибиотиков, гаптен-белковые конъюгаты, рецепторный анализ, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0132342322010067

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллины, относящиеся к группе бета-лактамов антибиотиков, широко используются в ветеринарной практике. Остаточные количества этих соединений могут присутствовать в продукции животного происхождения и поступать в организм человека, нанося существенный

вред здоровью. Они могут спровоцировать серьезные аллергические реакции, привести к изменению микрофлоры кишечника, а также служить причиной возникновения резистентных штаммов микроорганизмов [1]. В Евразийском экономическом союзе и Евросоюзе установлены максимально допустимые уровни остатков бета-лактамов в переработанной пищевой продукции животного происхождения. В частности, для пенициллина G, ампициллина (Amp) и амоксициллина (Amox) они составляют 4 мкг/кг в молоке и 50 мкг/кг в мясе [2, 3].

Для обеспечения биобезопасности продуктов питания предложены различные методы определения пенициллинов. Один из них – жидкостная хроматография с масс-селективной детекцией [4–6] – метод дорогостоящий, трудоемкий и длительный из-за сложной и продолжительной подготовки образцов перед анализом. Альтернативой

Сокращения: Amp – ампициллин; Amox – амоксициллин; BSA – бычий сывороточный альбумин; CR – перекрестная реактивность; DMF – диметилформамид; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; ELISA – иммуноферментный анализ; HRP – пероксидаза из корней хрена; HSA – сывороточный альбумин человека; rhLF – рекомбинантный лактоферрин человека; NHS – *N*-гидроксисукцинимид; sNHS – *N*-гидроксисульфосукцинимид; PBP – пенициллин-связывающий белок; PBS – натрий-фосфатный буфер; TG – тироглобулин; TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Автор для связи: (тел.: +375 (17) 395-92-75; эл. почта: kuprienko@iboch.by).

ему выступают быстрые и относительно недорогие иммунохимические методы. Для их разработки и применения необходимы белковые реагенты (рецепторы или антигена), способные к высокочувствительному связыванию пенициллинов, а также высокомолекулярные производные этих антибиотиков как гаптен — ферментные конъюгаты, иммуногены и конъюгированные антигены.

Белки, обладающие высоким специфическим сродством к пенициллинам, можно разделить на два вида. Первый — это пенициллин-связывающие белки (РВР), выполняющие у бактерий строительную и защитную функцию, такие как высокомолекулярная мембранная транспептидаза РВР2х из *Streptococcus pneumoniae* R6 [7] и карбокси-концевой фрагмент трансмембранного бета-лактамного рецептора BlaR-CTD из *Bacillus licheniformis* [8]. Эти белки распознают структуру антибиотика, включающую бета-лактамный цикл, и связывают различные бета-лактамы, относящиеся не только к пенициллинам, но и к цефалоспорином. Такая широкая специфичность бактериальных РВР — главное преимущество при использовании в рецепторно-аналитических системах, однако она же и ограничивает их применение, поскольку максимально допустимые уровни пенициллинов и цефалоспоринов в продуктах питания существенно различаются [2, 3].

Другой вид белков, способных связывать пенициллины, представлен специфическими антителами к ним. Описано получение как поликлональных [9–13], так и моноклональных антител [14–16] к пенициллинам. Также получены антитела, которые распознают расщепленные гидролизом бета-лактамные антибиотики [13, 17]. Лишь в единичных случаях чувствительность к пенициллинам систем иммуноферментного анализа (ELISA), в которые включены упомянутые антитела, составляет ~1 нг/мл [10, 13, 16]. С учетом максимальных допустимых уровней бета-лактамов в продуктах питания такая чувствительность ELISA может быть недостаточной при определении пенициллина G, Amp и Amox в молоке, разведенном в 5–10 раз. При этом многократное разведение образца — зачастую единственный способ снижения неспецифического влияния его компонентов на взаимодействие антитело—антиген.

Удобный вариант иммунохимических и рецепторных систем — хроматографический анализ в формате тест-полосок. Описан иммунохроматографический анализ широкого спектра бета-лактамов с использованием РВР [18, 19] и специфического к Amp моноклонального антитела [20].

В литературе предложены разные подходы к получению конъюгатов бета-лактамных антибиотиков с белками. Описано использование кросс-линкеров, обеспечивающих алифатиче-

скую или ароматическую вставку между белком и антибиотиком [7, 9–11, 14, 15, 18], применение соединений, непосредственно (без линкеров) ковалентно связывающих антибиотик с белком [7–10, 12, 14, 15, 19], “физиологический” метод конъюгирования, в основе которого лежит высокая реакционная способность бета-лактамного цикла [7, 13, 14]. Каждый из этих методов не лишен недостатков. Так, использование глутарового альдегида ограничено высокой вероятностью сшивки полипептидных цепей белков и получения конъюгатов с нестабильными физико-химическими свойствами. Из-за наличия в структуре аминокислотной группы применение водорастворимого карбодиимида не гарантирует получение конъюгатов только по одной из групп. Иммунореагенты, синтезированные по “физиологическому” пути, не могут быть использованы в биоанализе на основе рецепторных белков, а применение их в анализе с участием специфических антител требует проводить пробоподготовку, обеспечивающую полное разрушение бета-лактамного цикла антибиотика в составе образца продукта [13, 17].

Цель данного исследования — разработка нового способа синтеза конъюгатов аминокислотных пенициллинов с белками, который основан на формировании устойчивой связи между белком и гаптенем, исключает возможность образования внутри- и межмолекулярных сшивок полипептидных цепей и не приводит к разрушению бета-лактамного кольца пенициллинов. В круг задач также входило получение высокоаффинных к ампициллинам антител, которые в комбинации с синтезированными по предложенной методике конъюгатами могут быть использованы в высокочувствительных тест-системах ELISA для определения пенициллинов в продуктах питания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез производных аминокислотных пенициллинов и их конъюгатов с белками. Предложен двухстадийный метод получения конъюгатов аминокислотных пенициллинов с использованием гомобифункциональных кросс-линкеров. Он заключается в синтезе *N*-гидроксисукцинимидных эфиров (OSu-эфиров) карбокси-производных аминокислотных пенициллинов и выделении их из реакционной среды с возможностью продолжительного хранения и последующего простого и быстрого конъюгирования с белками.

Один из использованных в работе кросс-линкеров — ди-*N*-гидроксисукцинимидный эфир терефталевой кислоты $p\text{Ph}(\text{OSu})_2$ — получали из соответствующего дихлорангидрида, к раствору которого в хлористом метиле добавляли 3.5-кратный избыток *N*-гидроксисукцинимид (NHS). В результате реакции, протекающей в

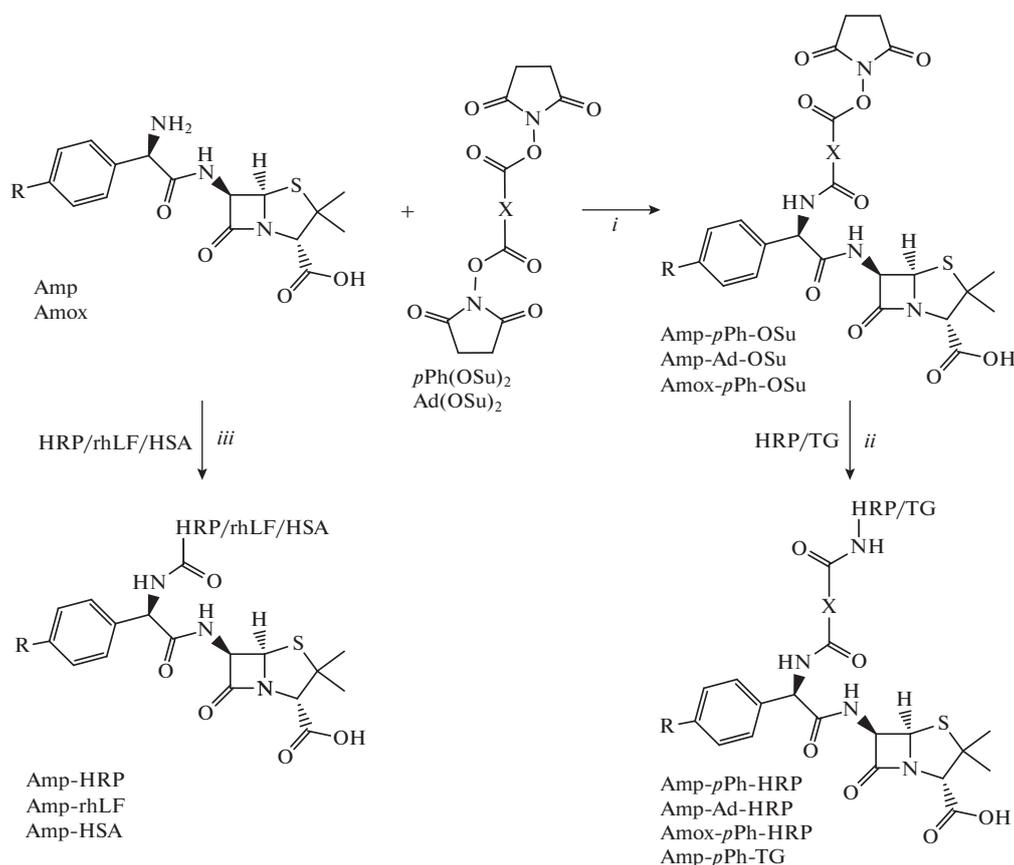


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов аминопенициллинов. Условия реакции: *i* – DMF, Et₃N, 3 ч, 20–25°C; *ii* – 0.1 M NaHCO₃, pH 8.3, 16 ч, 4°C; *iii* – EDC или EDC/sNHS, pH 6.0, 16 ч, 4°C. Формулы заместителей R и линкеров X приведены в табл. 1.

присутствии основания, продукт $p\text{Ph}(\text{OSu})_2$ выпадал в виде белого осадка. Ди-*N*-гидриксукцинимидный эфир адипиновой кислоты $\text{Ad}(\text{OSu})_2$ синтезировали с использованием диизопропилкарбодиимида, который приливали к раствору смеси адипиновой кислоты и NHS в дioxане. $\text{Ad}(\text{OSu})_2$ осаждали из реакционной среды диэтиловым эфиром после удаления осадка диизопропилмочевины, также образовавшейся в результате реакции. Структуры синтезированных кросс-линкеров подтверждены данными ЯМР- и масс-спектров. В спектре ¹H-ЯМР $p\text{Ph}(\text{OSu})_2$ присутствуют сигналы протонов метиленовых групп сукцинимидного фрагмента (δ 2.92 м.д.) и бензольного кольца (δ 8.34 м.д.), в спектре ¹H-ЯМР $\text{Ad}(\text{OSu})_2$ – сигналы протонов метиленовых групп сукцинимидного фрагмента (δ 2.81 м.д.) и адипиновой кислоты (δ 1.68–1.74 и 2.74 м.д.). В масс-спектре синтезированных кросс-линкеров наблюдали пики, соответствующие молекулярным ионам $[\text{M} + \text{Na}]^+$ и $[2\text{M} + \text{Na}]^+$.

Схема синтеза “линкерных” конъюгатов аминопенициллинов представлена на рис. 1. Структуры заместителя R и линкера X, а также характеристики использованных исходных реагентов и полученных производных антибиотиков приведены в табл. 1. На первой стадии растворы Amp или Amox в органическом растворителе добавляли к 1.1–1.2-кратному мольному избытку диэфира $p\text{Ph}(\text{OSu})_2$ или $\text{Ad}(\text{OSu})_2$. О полноте протекания реакции судили по исчезновению окрашиваемого нингидрином пятна на пластинке для тонкослойной хроматографии. Из реакционной среды активированные эфиры Amp-*pPh*-OSu, Amp-Ad-OSu или Amox-*pPh*-OSu осаждали диэтиловым эфиром. В масс-спектрах полученных производных аминопенициллинов наблюдали протонированные молекулы $[\text{M} + \text{H}]^+$ и молекулярные ионы $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (табл. 1).

На второй стадии навески синтезированных производных аминопенициллинов растворяли в диметилформамиде (DMF), их 20-кратные мольные избытки добавляли к растворам пероксидазы из корней хрена (HRP) в 0.1 M NaHCO₃, pH 8.3 (объемная доля органического растворителя в ко-

Таблица 1. Производные аминопенициллинов и исходные реагенты для синтеза конъюгатов

Соединение	Заместитель R	Линкер X	<i>m/z</i>	Степень включения, моль антибиотика/ моль белка
Amp	H	—	—	—
Amox	OH	—	—	—
<i>p</i> Ph(OSu) ₂	—	C ₆ H ₄	383.0 [M + Na] ⁺ , 743.1 [2M + Na] ⁺	—
Ad(OSu) ₂	—	C ₄ H ₈	363.1 [M + Na] ⁺ , 703.2 [2M + Na] ⁺	—
Amp- <i>p</i> Ph-OSu	H	C ₆ H ₄	595.2 [M + H] ⁺ , 617.1 [M + Na] ⁺	—
Amp-Ad-OSu	H	C ₄ H ₈	575.2 [M + H] ⁺ , 597.2 [M + Na] ⁺	—
Amox- <i>p</i> Ph-OSu	OH	C ₆ H ₄	611.1 [M + H] ⁺ , 633.1 [M + Na] ⁺	—
HRP	—	—	43278	—
rhLF	—	—	79599	—
HSA	—	—	66495	—
Amp- <i>p</i> Ph-HRP	H	C ₆ H ₄	43795	1.1
Amp-Ad-HRP	H	C ₄ H ₈	43507	0.5
Amox- <i>p</i> Ph-HRP	OH	C ₆ H ₄	43562	0.6
Amp- <i>p</i> Ph-TG	H	C ₆ H ₄	—	H/o*
Amp-HRP	H	—	44087	1.8
Amp-rhLF	H	—	83882	12.3
Amp-HSA	H	—	66914	1.2

Примечание: конъюгаты синтезировали по схеме, приведенной на рис. 1.

* Из-за слишком большой молекулярной массы TG не удалось использовать метод масс-спектрометрии для определения молекулярной массы конъюгата и расчета степени включения Amp.

нечной реакционной смеси не превышала 5%), и выдерживали в течение 16 ч при 4°C. Модификацию тироглобулина (TG) проводили в аналогичных условиях, используя существенно больший (670-кратный) мольный избыток Amp-*p*Ph-OSu. В результате получены конъюгаты, в которых молекула Amp или Amox через шестичленный алифатический мостик или ароматическое ядро присоединена к аминокруппам остатков аминокислот полипептидной цепи белка. Степень включения антибиотиков в конъюгаты определяли после удаления избытков несвязавшихся реагентов, сравнивая масс-спектры исходных и модифицированных белков (табл. 1). Из-за слишком большой молекулярной массы TG вывод о его превращении в Amp-*p*Ph-TG делали на основании существенного возрастания поглощения света раствором этого конъюгата в диапазоне 250–280 нм.

Следует отметить, что Cliquet et al. [14] уже использовали схожую вставку ароматического фрагмента между молекулами Amp и белка. Amp ацилировали OSu-эфиром 3-малеимидобензойной кислоты и добавляли к растворам бычьего сывороточного альбумина (BSA) или овальбумина, в молекулы которых предварительно в результате двухстадийной модификации были введены

дополнительные сульфгидрильные группы. Предложенный нами метод синтеза конъюгатов аминопенициллинов с использованием ди-OSu-эфиров проще и быстрее, не требует продолжительной модификации белка и приводит к получению стабильных связей.

Синтез “безлинкерных” конъюгатов Amp-HRP и Amp-rhLF осуществляли по той же схеме (рис. 1), добавляя водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) к смеси Amp с HRP или рекомбинантным лактоферрином человека (rhLF). Синтез Amp-HSA проводили по ранее предложенной методике [19] через промежуточную стадию получения активированного эфира Amp в результате взаимодействия антибиотика с *N*-гидроксисульфосукцинимидом (sNHS) в присутствии EDC, который затем добавляли к раствору сывороточного альбумина человека (HSA). Степень включения Amp, рассчитанная на основании масс-спектров конъюгатов и исходных белков, приведена в табл. 1.

Связывание низкомолекулярных производных и ферментных конъюгатов аминопенициллинов с РВР. Пенициллины – неустойчивые соединения из-за лабильности бета-лактамного кольца. Для того чтобы выяснить, происходит ли разрушение

Таблица 2. Результаты воздействия условий синтеза линкерных конъюгатов Амр на его связывание с РВР

№	Условия воздействия	Выдерживание	Связывающая активность, %
1	Амр в воде свежеприготовленный (50 мкг/мл)	—	100
2	Амр в воде (50 мкг/мл)	–20°C, 1 месяц	95
3	Амр в воде (50 мкг/мл)	4°C, 16 ч	103
4	Амр в 0.1 М NaHCO ₃ , pH 8.3 (50 мкг/мл)	4°C, 16 ч	104
5	Амр в 0.1 М NaHCO ₃ , pH 8.3 (50 мкг/мл)	37°C, 16 ч	37
6	Амр в DMF и 1%-ном Et ₃ N (10 мкг/мл)	25°C, 3 ч	105
7	Амр из раствора № 6 после упаривания растворителя и последующего растворения в DMF (10 мкг/мл)	50°C, 30 мин	100
8	Амр- <i>p</i> Ph-OSu в DMF и 1%-ном Et ₃ N (10 мкг/мл)	25°C, 3 ч	100

бета-лактамно цикла антибиотиков в условиях синтеза производных, проверяли их связывающую активность в отношении РВР, распознающего интактную бета-лактамную группировку. Ранее этот РВР использовали в непрямом рецепторном анализе в микропланшетном формате и рецепторно-хроматографической тест-системе для определения бета-лактамных антибиотиков [19]. В нашей работе с применением этого белка исследована устойчивость бета-лактамного кольца Амр в условиях ацилирования антибиотика диэфиром *p*Ph(OSu)₂ (органический растворитель DMF, основание Et₃N, повышенная температура) и синтеза белковых конъюгатов (pH 8.3, 16 ч при 4°C). В табл. 2 приведены значения связывающей активности Амр и его производных, рассчитанные так, как описано в “Эксперим. части”. Обнаружено, что кратковременное нагревание до 50°C раствора Амр в DMF в присутствии основания Et₃N, выдерживание раствора антибиотика в течение 16 ч при 4°C в 0.1 М NaHCO₃ (pH 8.3) и ацилирование аминогруппы ди-*N*-гидроксисукцинимидным эфиром *p*Ph(OSu)₂ не приводят к изменению взаимодействия Амр с РВР (связывающая активность находилась в пределах 95–105%, что соответствует допустимой вариации результатов биоанализа). В то же время после инкубации Амр в растворе с pH 8.3 при 37°C в течение более длительного времени, чем продолжительность синтеза, наблюдалось уменьшение связывания антибиотика в системе рецепторного анализа на 63%. Таким образом, показано, что ни на одном этапе синтеза низкомолекулярного производного Амр и его белковых конъюгатов не происходит разрушение бета-лактамного цикла.

В системе конкурентного рецепторного анализа провели сравнение характеристик связывания синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов. Для получения колориметрического сигнала A₄₅₀ в диапазоне 1.4–1.6 о.е. линкерные конъюгаты Амр-*p*Ph-HRP, Амр-Ad-

HRP и Амox-*p*Ph-HRP использовали в концентрации 0.5 мкг/мл, а безлинкерный конъюгат Амр-HRP – 2.5 мкг/мл. Показано, что линкерные конъюгаты взаимодействуют с РВР в присутствии возрастающих количеств Амр одинаковым образом, отличающимся от характера связывания “прямого” конъюгата Амр-HRP. Аналитическая чувствительность модельных рецепторных систем с использованием линкерных конъюгатов или Амр-HRP составляла в среднем 0.11 и 0.25 нг/мл соответственно. В этих системах концентрация Амр, вызывающая 50%-ное ингибирование связывания пероксидазных конъюгатов (IC₅₀) Амр-*p*Ph-HRP, Амр-Ad-HRP и Амox-*p*Ph-HRP, в среднем составляла 0.60 нг/мл, а при использовании Амр-HRP – 0.76 нг/мл (рис. 2). Такая разница может

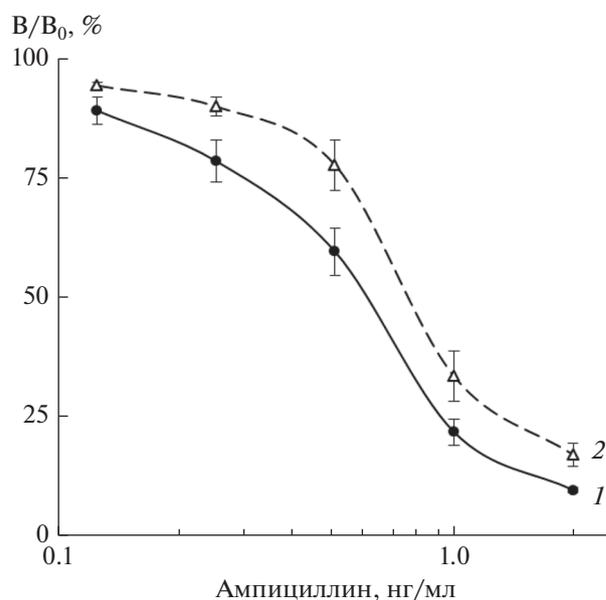


Рис. 2. Конкурентное связывание синтезированных ферментных конъюгатов с РВР в присутствии возрастающих количеств Амр: 1 – Амр-Ad-HRP; 2 – Амр-HRP.

быть связана с частичным разрушением бета-лактамового кольца в ходе синтеза конъюгата Amp-HRP. Причиной также может выступать меньшая доступность антибиотика в составе конъюгата, в котором ампициллин напрямую связан с белком.

Иммуногенные конъюгаты аминопеницилинов в получении поликлональных антител. Синтезированные конъюгаты Amp-*p*Ph-TG и Amp-rhLF использовали для наработки поликлональных антител к ампициллину в результате иммунизации двух групп кроликов. Для оценки иммуногенности конъюгатов полученные антисыворотки испытывали в биоаналитической системе непрямого ELISA, включающей иммобилизованный на твердой фазе безлинкерный конъюгат Amp-HSA с низким включением антибиотика, а также Amp в возрастающих концентрациях и антисыворотки в различных разведениях. Для выявления количества связавшихся специфических антител использовали ферментный конъюгат антител козы против иммуноглобулинов кролика и цветную реакцию окисления ТМВ в присутствии H₂O₂, катализируемую HRP. Интенсивность детектируемого сигнала A₄₅₀ зависела от содержания анти-Amp-антител в образце антисыворотки и концентрации Amp в жидкой фазе системы. Установленные параметры непрямого ELISA в сравнении с литературными данными [12] приведены в табл. 3. Рабочий титр антисывороток, полученных в результате иммунизации конъюгатом Amp-*p*Ph-TG, оказался в ~3 раза выше, чем в случае использования в качестве иммуногена Amp-rhLF.

Повышенная иммуногенность первого конъюгата может быть связана с природой белка-носителя. Ранее группой ученых было показано, что использование TG для получения антител к Amp предпочтительнее применения белков с меньшей молекулярной массой, таких как BSA или овальбумин [14]. Мы подтвердили ранее установленный факт, что введение в молекулу иммуногена

ароматического линкера между Amp и белком-носителем не мешает наработке специфических анти-Amp-антител [14]. Более того, нами показано, что использование иммуногена такой структуры способствует формированию антител с высокой чувствительностью к пенициллинам.

Ранее исследователи обращали внимание на то, что в группе кроликов только отдельные особи активно отвечают на введение иммуногена, содержащего ампициллин [9, 10]. Нами также обнаружено, что чувствительность продуцируемых антител к Amp в непрямом ELISA существенно различалась не только между группами кроликов, но и внутри группы, иммунизированной одним и тем же конъюгатом. Так, в случае иммуногена Amp-rhLF аналитическая чувствительность анализа варьировалась в диапазоне 2–20 нг/мл, а при введении конъюгата Amp-*p*Ph-TG – в диапазоне 0.1–1.0 нг/мл.

Следует отметить, что нами получены антитела, характеризующиеся групповой специфичностью к пенициллинам, с помощью которых в одном анализе может быть определено суммарное содержание по меньшей мере трех антибиотиков пенициллинового ряда: ампициллина, пенициллина G и амоксициллина (другие члены ряда не испытывались). При иммунизации кроликов конъюгатом, синтезированным с использованием в качестве кросс-линкера глутарового альдегида [9, 10], получены антитела со схожей групповой специфичностью, однако по параметру “чувствительность” они существенно уступают лучшим поликлональным антителам, описанным в данной работе.

Поликлональные антитела и пероксидазные конъюгаты в прямом ELISA. Иммуноаналитические свойства синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопеницилинов изучены в модельных гетерофазных системах прямого взаимодействия с биоспецифически иммобилизованными антителами из антисывороток к Amp-*p*Ph-TG

Таблица 3. Параметры аналитических систем непрямого ELISA антибиотиков пенициллинового ряда с использованием лучших антисывороток к Amp-*p*Ph-TG и Amp-rhLF, полученных в данной работе, в сравнении с ранее опубликованными результатами

Параметр	Amp- <i>p</i> Ph-TG	Amp-rhLF	Amp-BSA*
Титр антисыворотки	1 : 30000	1 : 10000	1 : 30000–1 : 60000
V ₀ , о.е.	2.0	1.6	1.0
Аналитическая чувствительность, нг/мл	0.1	2.0	5.0
IC ₅₀ , нг/мл	2.0	61	62
Перекрестная реактивность, %			
Ампициллин	100	100	100
Пенициллин G	48	305	10
Амоксициллин	200	102	<0.1

* Результаты, полученные в работе Самсоновой с соавт. [12].

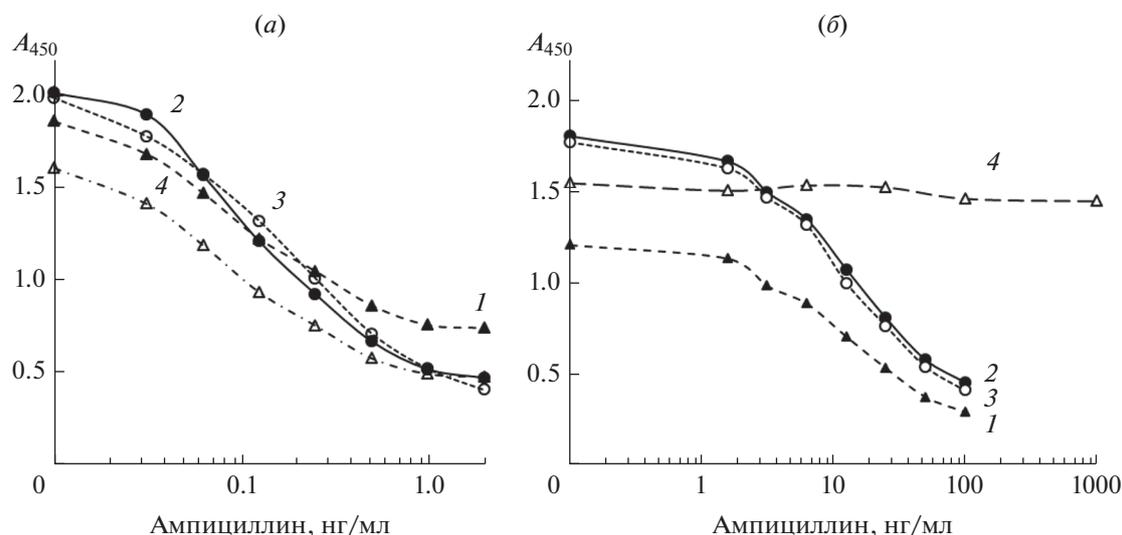


Рис. 3. Связывание синтезированных ферментных конъюгатов с иммобилизованными специфическими поликлональными антителами из антисывороток кроликов к иммуногенам *Ampr-pPh-TG* (а) и *Ampr-rhLF* (б): 1 – *Ampr-pPh-HRP*; 2 – *Amp-Ad-HRP*; 3 – *Amox-pPh-HRP*; 4 – *Amp-HRP*.

и *Ampr-rhLF*. В случае антисыворотки к *Ampr-pPh-TG* (рис. 3а) конъюгаты, содержащие линкеры, использовали в концентрации 0.07 мкг/мл, безлинкерный конъюгат *Amp-HRP* – в концентрации 0.25 мкг/мл. Аналитическая чувствительность составила в среднем 0.03 нг/мл для всех ферментных конъюгатов (описание расчета приведено в “Эксперим. части”). Параметр IC_{50} варьировался от 0.20 до 0.40 нг/мл, причем его максимальное значение наблюдали в случае использования конъюгата *Ampr-pPh-HRP*. Для этого же конъюгата отмечено, что в конце калибровочного графика его связывание с антителами составило 40% от максимального. В то же время конъюгаты *Amp-Ad-HRP*, *Amox-pPh-HRP* и *Amp-HRP* вытеснялись *Amp* в концентрации 2 нг/мл на 70–80%.

Определено, что синтезированные линкерные конъюгаты *Ampr-pPh-HRP*, *Amp-Ad-HRP* и *Amox-pPh-HRP* взаимодействуют с антителами из антисыворотки к *Ampr-rhLF* схожим образом (рис. 3б). Ферментный конъюгат *Ampr-pPh-HRP* использовали в прямом ELISA в концентрации 0.3 мкг/мл, конъюгаты *Amp-Ad-HRP* и *Amox-pPh-HRP* – в концентрации 0.5 мкг/мл. Чувствительность анализа составила 2.0 нг/мл, величина IC_{50} была 17–20 нг/мл. Совпадающий по общей структуре с иммуногеном конъюгат *Amp-HRP*, взятый в концентрации 0.3 мкг/мл, образовывал комплексы с антителами к *Ampr-rhLF*, однако не вытеснялся из них даже при использовании ампициллина в концентрации 1 мкг/мл.

Таким образом, показано, что прямой ELISA с использованием антител к *Ampr-pPh-TG* чувствительнее непрямого анализа (табл. 3). Результаты, полученные в прямом ELISA (рис. 3), подтверди-

ли, что антитела из антисыворотки к *Ampr-pPh-TG* более чувствительны к антибиотикам группы пенициллинов, чем поликлональные антитела из антисыворотки к *Ampr-rhLF*. Кроме того, нами, как и ранее Wang et al. [21], продемонстрировано, что гетерологичные конструкции иммуногена и конъюгированного антигена, отличающиеся по структуре гаптена, использованного для их синтеза, обеспечивают лучшие параметры иммуноанализа. Причем в случае антисыворотки к *Ampr-pPh-TG* этот эффект наблюдали как при изменении линкера между гаптенем и белком, так и при сохранении линкерного фрагмента неизменным и переходе от *Amp* к *Amox*.

В наиболее чувствительной из использованных модельных систем прямого ELISA определили динамику продуцирования специфических поликлональных антител и провели контроль их антиген-связывающей активности (связывание ферментного конъюгата и IC_{50}) при введении кролику иммуногена *Ampr-pPh-TG* (рис. 4). Показано, что антисыворотка с лучшими характеристиками связывания получена по истечении 33 недель с начала иммунизации, т.е. после десятого введения иммуногена. При дальнейшей иммунизации чувствительность и специфичность антител в антисыворотке остались на прежнем уровне, концентрация специфических антител не увеличилась. Ранее в литературе также сообщалось о необходимости продолжительной иммунизации кроликов для получения антител, специфических к пенициллинам [10]. Однако опубликованы и сведения о возможности быстрого получения антисыворотки с высоким титром [12],

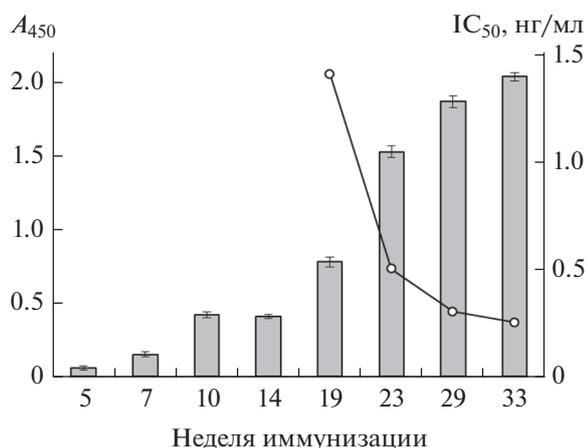


Рис. 4. Связывание ферментного конъюгата Amp-Ad-HRP с иммобилизованными антителами из антисыворотки кролика к Amp-pPh-TG, взятой на разных неделях процедуры иммунизации. Сплошная линия – IC₅₀ для Amp в прямом ELISA.

но с низкой аналитической чувствительностью (~5.0 нг/мл).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали ампициллина тригидрат, амоксициллина тригидрат, натриевую соль пенициллина G, BSA, EDC, sNHS, NHS, дихлорангидрид терефталевой кислоты, адипиновую кислоту, диизопропилкарбодиимид, DMF, триэтиламин, ТМВ, полный адъювант Фрейнда, Tween-20, антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченые HRP (Sigma-Aldrich, США), HRP (Panreac Quimica SLU, Испания). RBP – рекомбинантный аналог природного рецептора RBP2x из *Streptococcus pneumoniae* R6 и моноклональное антитело к нему приобретены у Glory Sciences Co., Ltd, КНР (www.glorybios.com).

TG, выделенный из экстрактов послеоперационной ткани щитовидной железы человека, и два типа очищенных антител овцы против иммуноглобулинов мыши и кролика получены от УП “ХОП ИБОХ НАН Беларуси”. HSA предоставлен РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Республика Беларусь). rhLF выделен и очищен в Институте микробиологии НАН Беларуси из молока коз-продуцентов, трансгенных по гену лактоферрина человека.

Соли, основания, кислоты и органические растворители белорусских и российских производителей имели классификацию не ниже ч.д.а. Буферные растворы готовили на деионизированной воде с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм см, полученной в модульной системе очистки воды Arium® pro VF (Sartorius, Германия).

Пероксидазные конъюгаты аминопенициллинов очищали на колонке с Superose 12 (1.0 × 30.0 см), уравновешенной 0.15 М NaCl, при скорости потока 12 мл/ч в автоматическом режиме на установке для быстрой хроматографии белков (Pharmacia Biotech, Швеция).

ELISA выполняли в разборных микропланшетах из полистирола, состоящих из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), купленных у Greiner Bio-One (Германия) или ООО “Хемамедика” (Россия).

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на приборе AVANCE 500 (Bruker BioSpin GmbH, Германия) в d₆-DMCO. Химические сдвиги определяли относительно остаточных сигналов растворителей. Масс-спектры OSu-эфиров получали с использованием масс-селективного детектора Agilent 6410 Triple Quad в комплекте с жидкостным хроматографом Agilent 1200 SL (Agilent Technologies, Inc., США). Определение молекулярных масс белков и их конъюгатов методом масс-спектрометрии проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометра Microflex LRF System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Измерение колориметрического сигнала в лунках микропланшета проводили с помощью приборов АИФ М/340 (ОАО “Витязь”, Беларусь) и iMark™ (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)терефталат, pPh(OSu)₂. К охлажденному на бане со льдом раствору 1.00 г (4.9 ммоль) дихлорангидрида терефталевой кислоты в 30 мл хлористого метилена добавляли 2.00 г (17.4 ммоль) NHS и 2.4 мл (17.4 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 30 мин при охлаждении и 48 ч при 20–25°C. Выпавший осадок pPh(OSu)₂ отфильтровывали, промывали 5 мл хлористого метилена, суспендировали в 20 мл этого растворителя, опять отфильтровывали и высушивали в вакуумном эксикаторе с P₂O₅ при 20–25°C. Получили 1.37 г (78%) диэфира pPh(OSu)₂. Масс-спектр: m/z 383.0 [M + Na]⁺, 743.1 [2M + Na]⁺. C₁₆H₁₂N₂O₈. Вычислено: 360.1. Спектр ¹H-ЯМР (DMCO-d₆) δ: 2.92 (8H, c, 2 × –OC–CH₂–CH₂–CO–), 8.34 (4H, c, 4 × CH). Спектр ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆) δ: 25.6, 130.1, 131.0, 161.0, 170.2.

Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)адипинат, Ad(OSu)₂. К раствору 0.44 г (3.0 ммоль) адипиновой кислоты в 15 мл диоксана добавляли 0.73 г (6.3 ммоль) NHS, перемешивали при охлаждении на ледяной бане в течение 10 мин и вносили 0.97 мл (6.3 ммоль) диизопропилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 10–15°C и 20 ч при 20–25°C. Выпавший осадок диизопропилмочевины отфильтровывали, из фильтра отгоняли значительную часть растворителя и добавляли диэтиловый эфир. В результате выпадал ди-N-гидроксисукцинимидный эфир

Ad(OSu)₂, который повторно растворяли в диоксане и опять осаждали диэтиловым эфиром. Надосадочную жидкость сливали, целевое соединение высушивали в вакуумном эксикаторе с P₂O₅ при 20–25°C. Получили 0.57 г (56%) диэфира Ad(OSu)₂. Масс-спектр: *m/z* 363.1 [M + Na]⁺, 703.2 [2M + Na]⁺. C₁₄H₁₆N₂O₈. Вычислено: 340.1. Спектр ¹H-ЯМР (d₆-DMCO) δ: 1.68–1.74 (4H, м, 2 × –OOC–CH₂–CH₂–), 2.74 (4H, т, *J* 6.1 Гц, 2 × (–OOC–CH₂–)), 2.81 (8H, с, 2 × (–OC–CH₂–CH₂–CO–)). Спектр ¹³C-ЯМР (d₆-DMCO) δ: 23.3, 25.5, 29.7, 168.8, 170.3.

OSu-эфиры аминопенициллинов. К раствору 50.0 мг (139 мкмоль) *p*Ph(OSu)₂ или 50.0 мг (147 мкмоль) Ad(OSu)₂ в 2 мл DMF добавляли 50.0 мг (124 мкмоль) ампициллина тригидрата. Затем приливали 50 мкл (360 мкмоль) триэтиламина и перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч. За ходом реакции следили по тонкослойной хроматографии в системе этилацетат–метанол–уксусная кислота 4 : 2 : 1, проявляли пластинки УФ-светом и раствором нингидрина в *n*-бутаноле. Растворитель упаривали при 50°C, остаток растворяли в метаноле и осаждали продукт диэтиловым эфиром. Надосадочную жидкость сливали, осадок промывали диэтиловым эфиром и высушивали в вакуумном эксикаторе с P₂O₅ при 20–25°C. Выход составил 71 и 90% для Amp-*p*Ph-OSu и Amp-Ad-OSu соответственно.

Синтез производного Amox проводили аналогичным образом, используя 50.0 мг (119 мкмоль) амоксициллина тригидрата и 50.0 мг (139 мкмоль) *p*Ph(OSu)₂. Выход Amox-*p*Ph-OSu составил 76%.

Выделенные OSu-эфиры аминопенициллинов использовали для синтеза конъюгатов без дополнительной очистки.

Пероксидазные конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP. К 0.5 мл раствора 2.0 мг (46 нмоль) HRP в 0.1 М NaHCO₃ приливали 25 мкл раствора 0.55 мг (920 нмоль) Amp-*p*Ph-OSu, 0.53 мг (920 нмоль) Amp-Ad-OSu или 0.56 мг (920 нмоль) Amox-*p*Ph-OSu в DMF. Перемешивали и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Очистку пероксидазных конъюгатов Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP проводили гель-фильтрацией на колонке с Superose 12 в режиме быстрой хроматографии белков.

Иммуноген Amp-*p*Ph-TG. К 6.0 мл 28.0 мг (42 нмоль) раствора TG в 0.1 М NaHCO₃ добавляли 16.7 мг (28 мкмоль) Amp-*p*Ph-OSu в 0.3 мл DMF. Перемешивали и инкубировали 4 ч при 20–25°C, очищали обессоливанием на Sephadex G-25, уравновешенной 0.15 М NaCl.

Конъюгаты Amp-HRP и Amp-rhLF синтезировали по методикам, предложенным ранее [7, 9, 12], с некоторыми модификациями. К раствору 2.0 мг

(46 нмоль) HRP в 0.1 М MES-буфере (pH 6.0) и 0.15 М NaCl добавляли 2.0 мг (5.0 мкмоль) ампициллина тригидрата и 2.0 мг (10 мкмоль) EDC. Инкубировали в течение 16 ч при 4°C, затем очищали гель-фильтрацией в автоматическом режиме. Иммуноген Amp-rhLF получали аналогичным образом, очищали обессоливанием на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной 0.15 М NaCl.

Конъюгат Amp-HSA синтезировали по ранее предложенной методике [19], используя 0.8 мг (2.3 мкмоль) Amp, 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 15 мг (0.2 мкмоль) HSA. Очистку конъюгата проводили хроматографией на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной 0.02 М натрий-фосфатным буфером (PBS).

Буферные растворы. PBS содержал 0.05 М раствор смеси гидро- и дигидрофосфата натрия (pH 7.4) и 0.15 М NaCl. Блокирующий буферный раствор приготовлен на основе PBS, содержал 5 г/л BSA. Раствор для иммобилизации специфических антител и проведения ELISA включал PBS, 1 г/л BSA, 0.02% Tween-20. Буфер для промывания лунок планшета содержал PBS и 0.02% Tween-20. Хромоген-субстратную смесь готовили, добавляя одну часть 0.4 мМ раствора TMB в диметилсульфоксиде к 20 частям 3.0 мМ H₂O₂ в 0.04 М натрий-цитратном буфере (pH 4.0). Стоп-раствор представлял собой 1 М H₂SO₄.

Рецепторный анализ. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл 5 мкг/мл раствора антител овцы к иммуноглобулинам мыши в 0.1 М NaHCO₃. Инкубировали 16 ч при 4°C, затем содержимое лунок удаляли, лунки промывали, вносили в них по 200 мкл блокирующего буферного раствора и снова инкубировали 16 ч при 4°C. Далее раствор из лунок выливали, вносили по 100 мкл моноклонального антитела к РВР в концентрации 2 мкг/мл в буферном растворе и проводили иммунохимическую иммобилизацию антитела, выдерживая планшет в течение 16 ч при 4°C. Затем раствор из лунок удаляли и вносили 50 мкл растворов Amp в диапазоне концентраций 0.1–4.0 нг/мл, 25 мкл растворов синтезированных пероксидазных конъюгатов в подобранном разведении и 25 мкл 0.25 мкг/мл раствора РВР. Проводили инкубацию в течение 1 ч при 20–25°C, промывали лунки моющим буфером, вносили по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, инкубировали 15 мин при 20–25°C, затем добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Проверка устойчивости бета-лактаманного кольца в условиях получения производных аминопенициллинов. В ходе синтеза эфира Amp-*p*Ph-OSu отбирали по 10 мкл реакционной среды, из которой готовили растворы с концентрациями Amp 0.1–4.0 нг/мл. Растворы с такими же концентрациями

Амр готовили из растворов 50 мкг/мл Амр в воде или 0.1 М NaHCO₃, предварительно выдержанных в течение 1 месяца при –20°C, 16 ч при 4°C или 16 ч при 37°C. Приготовленные растворы Амр и его производных использовали в рецепторном анализе, описанном выше. Рассчитывали связывающую активность относительно свежеприготовленного раствора Амр по формуле для расчета CR, как описано ниже в подразделе “Аналитические характеристики биоанализа”, используя в качестве соединения X ампициллин, подвергнутый воздействию исследуемых условий.

Получение антисыворотки к Амр. Использовали половозрелых самок кроликов породы шинилла весом 2.5 кг, которых содержали в условиях вивария. Две группы животных по три особи в каждой иммунизировали синтезированными конъюгатами Амр-рPh-TG или Амр-rhLF. В первую иммунизацию подкожно в область шеи вводили по 1.0 мг иммуногена в 1 мл смеси равных объемов 0.15 М NaCl и полного адьюванта Фрейнда. Через 2–3 недели повторно подкожно вводили по 0.5 мг конъюгированного антигена в 0.5 мл смеси равных объемов 0.15 М NaCl и неполного адьюванта Фрейнда. Последующие инъекции конъюгатов в неполном адьюванте Фрейнда проводили с интервалом 4–6 недель, забор крови осуществляли на 7–10-й день после иммунизации. Кровь отбирали из краевой вены уха в пробирки с активаторами свертывания. Сыворотку отделяли центрифугированием. Титр антисыворотки в ELISA определяли как кратность ее разведения, при которой колориметрический сигнал A₄₅₀ составлял 1.2–2.0 о.е.

Система непрямого ELISA. Конъюгат Амр-HSA иммобилизовали на внутренней поверхности лунок полистирольного микропланшета из 100 мкл раствора с концентрацией 0.25 мкг/мл в 0.01 М NaHCO₃ путем инкубации в течение 18 ч при 4°C. Затем содержимое лунок планшета удаляли и вносили по 150 мкл блокирующего буфера, инкубировали в течение 18 ч при 4°C. В лунки вносили по 50 мкл раствора Амр в диапазоне концентраций 0.01–1000 нг/мл и по 50 мкл раствора антисыворотки в титре от 1 : 5000 до 1 : 100000. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем лунки промывали, вносили в них по 100 мкл пероксидазного конъюгата антител козы к иммуноглобулинам кролика и проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C. После промывки твердой фазы в лунки добавляли по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, выдерживали в течение 15 мин при 20–25°C и добавляли 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Система прямого ELISA. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл 5 мкг/мл рас-

твора антител овцы к иммуноглобулинам кролика в 0.1 М растворе NaHCO₃ и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Затем содержимое лунок планшета удаляли, промывали лунки моющим буфером, вносили по 200 мкл блокирующего буфера и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Далее содержимое лунок удаляли, вносили по 100 мкл антисыворотки кролика к Амр-рPh-TG в титре 1 : 50000 или антисыворотки к Амр-rhLF в титре 1 : 20000, инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Лунки планшета промывали, добавляли по 50 мкл растворов Амр в диапазоне концентраций 0.03–1000 нг/мл и 50 мкл растворов синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов. Инкубировали 1 ч при 20–25°C, затем лунки промывали, вносили в них по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, выдерживали в течение 15 мин при 20–25°C и добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Аналитические характеристики биоанализа. Аналитическую чувствительность определяли как концентрацию Амр в нг/мл, при которой связывание пероксидазного конъюгата аминопеницилина или твердофазного антигена Амр-HSA с РВР или специфическими поликлональными антителами отличается от 100% на трехкратную величину ошибки измерения B₀; (B₀ – 3 SD). Параметр IC₅₀ находили как концентрацию раствора Амр, при внесении которого в лунки происходит 50%-ное ингибирование связывания РВР или анти-Амр-антител с конъюгатами Амр или Амox, выражающееся в уменьшении колориметрического сигнала в 2 раза по сравнению с лункой, не содержащей антибиотик. CR вычисляли по следующему уравнению:

$$CR(X) = \frac{IC_{50}(Amr)}{IC_{50}(X)} \times 100\%,$$

где CR(X) – перекрестная реактивность РВР или специфических поликлональных антител к соединению X; IC₅₀(Amr) – концентрация Амр, вызывающая снижение связывания РВР или специфических поликлональных антител с конъюгатом Амр на 50%, нг/мл; IC₅₀(X) – концентрация соединения X, вызывающая снижение связывания РВР или специфических поликлональных антител с конъюгатом Амр на 50%, нг/мл.

Все биоаналитические параметры измеряли не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На рис. 2 и 4 планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD), p < 0.05.

Если у читателей возникнет интерес к конъюгатам или антителам, полученным в данной работе, просим обращаться с запросами о передаче бесплатных образцов к автору для связи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате реакции ацилирования Amp и Амоксицилина-OSu-эфирами дикарбоновых кислот получены новые активированные эфиры карбокси-производных аминопенициллинов. С их использованием по простой методике с образованием устойчивой амидной связи синтезированы конъюгаты, в которых антибиотик и белок разделены ароматическим или алифатическим фрагментом. Установлено, что в ходе синтеза низкомолекулярных производных аминопенициллинов и в условиях дальнейшего получения белковых конъюгатов по предложенному методу не происходит разрушение бета-лактамового кольца антибиотика.

Проведено сравнение новых пероксидазных конъюгатов с алифатической или ароматической вставкой между антибиотиком и белком Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP, Амоксицилин-*p*Ph-HRP с конъюгатом, синтезированным в этой же работе путем прямого (безлинкерного) присоединения аминопенициллина непосредственно к остаткам аминокислот полипептидной цепи белка Amp-HRP. Методом рецепторного анализа выявлено, что РВР лучше взаимодействует с линкерными конъюгатами, чем с продуктами прямого присоединения аминопенициллинов к белку-носителю. Модельные рецепторные системы, включающие конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP или Амоксицилин-*p*Ph-HRP, дают возможность определять пенициллины с большей чувствительностью, чем система с конъюгатом Amp-HRP.

Важно отметить, что системы рецепторного биоанализа на основе РВР и пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов в форме готовых наборов реагентов могут применяться на практике для скрининговых исследований содержания широкого спектра бета-лактамов (пенициллинов и цефалоспоринов) в различных продуктах животного происхождения.

Антитела, полученные в результате продолжительной иммунизации кроликов конъюгатом Amp-*rh*LF (молекулярная масса белка-носителя – 80 кДа), имели низкую чувствительность в ELISA и чрезвычайно высокое сродство к конъюгату Amp-HRP. Для получения высокоаффинной антисыворотки с большим содержанием специфических к пенициллинам антител потребовалась иммунизация в течение такого же промежутка времени синтезированным линкерным конъюгатом Amp-*p*Ph-TG на основе белка с молекулярной массой 660 кДа. Эти поликлональные антитела также проявляли несколько большее сродство к пероксидазному конъюгату, схожему по структуре с иммуногеном, чем к остальным конъюгатам.

Показано, что в системе прямого ELISA с иммунохимически иммобилизованными поликлональными антителами (иммуноген – Amp-*p*Ph-TG) и конъюгатом Amp-Ad-HRP в жидкой фазе

Amp достоверно определяется в диапазоне концентраций 0.03–2.00 нг/мл, т.е. на порядок с более высокой чувствительностью, чем в иммуноаналитических системах, описанных в научной литературе.

Разработанная нами система может служить прототипом набора реагентов для ультрачувствительного двухстадийного (биоспецифическое связывание и колориметрическая детекция) прямого ELISA для выявления пенициллинов в пищевых продуктах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Работа не содержит описания исследований с использованием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Menkem Z.E., Ngangom B.L., Tamunjoh S.S.A., Boyom F.F. // *Acta Ecol. Sin.* 2019. V. 39. P. 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.10.004>
2. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28. <http://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800044>
3. Commission Regulation (EU) No. 37/2021 // *Off. J. Eur. Union.* 2010. V. 5. P. L15/1–72. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf
4. Riediker S., Diserens J.-M., Stadler R.H. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. P. 4171–4176. <https://doi.org/10.1021/jf010057k>
5. Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G., Galey F.D. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 406–411. <https://doi.org/10.1021/jf010994s>
6. Chiesa L.M., Nobile M., Panseri S., Biolatti B., Cannizzo F.T., Pavlovic R., Arioli F. // *J. Agric. Food Chem.* 2016. V. 64. P. 2635–2640. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00155>
7. Zeng K., Zhangy J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Wu C.M., Shen J.Z. // *Biomed. Environ. Sci.* 2013. V. 26. P. 100–109. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
8. Peng J., Cheng G., Huang L., Wang Y., Hao H., Peng D., Liu Z., Yuan Z. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 8925–8933. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
9. Usleber E., Litz S., Märtilbauer E. // *Food Agric. Immunol.* 1998. V. 10. P. 317–324. <https://doi.org/10.1080/09540109809354995>
10. Strasser A., Usleber E., Schneider E., Dietrich R., Bürk C., Märtilbauer E. // *Food Agric. Immunol.* 2003.

- V. 15. P. 135–143.
<https://doi.org/10.1080/09540100400003493>
11. *Bacigalupo M.A., Meroni G., Secundo F., Lelli R.* // *Talanta*. 2008. V. 77. P. 126–130.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.057>
 12. *Самсонова Ж.В., Шелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 668–675. [*Samsonova Z.V., Shchelokova O.S., Ivanova N.L., Rubtsova M.Y., Egorov A.M.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. P. 589–595.]
<https://doi.org/10.1007/s10438-005-0107-4>
 13. *Cliquet P., Goddeeris B.M., Okerman L., Cox E.* // *Food Agric. Immunol.* 2007. V. 18. P. 237–252.
<https://doi.org/10.1080/09540100701802908>
 14. *Cliquet P., Cox E., Van Dorpe C., Schacht E., Goddeeris B.M.* // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. P. 3349–3355.
<https://doi.org/10.1021/jf001428k>
 15. *Dietrich R., Usleber E., Märtlbauer E.* // *Analyst.* 1998. P. 123. P. 2749–2754.
<https://doi.org/10.1039/a805166f>
 16. *Jiao S.N., Wang P., Zhao G.X., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P.* // *J. Environ. Sci. Health. B.* 2013. V. 48. P. 486–494.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908>
 17. *Kotova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // *Orient. J. Chem.* 2020. V. 36. P. 21–25.
<https://doi.org/10.13005/ojc/360103>
 18. *Li Y., Xu X., Liu L., Kuang H., Xu L., Xu C.* // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 3257–3265.
<https://doi.org/10.1039/D0AN00421A>
 19. *Серченя Т.С., Горбачева И.В., Свиридов О.В.* // Биорг. химия. 2021. Т. 48. С. 63–74. [*Serchenya T.S., Gorbachyova I.V., Sviridov O.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 48.]
<https://doi.org/10.31857/S0132342322010122>
 20. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 685–693. [*Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011. V. 47. P. 627–634.]
<https://doi.org/10.1134/S0003683811060032>
 21. *Wang J., Shen X., Zhong P., Zhaodong Li, Tang Q., Huang X., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A., Xiao Z., Lei H., Li X.* // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2021. V. 8. P. 17.
<https://doi.org/10.1186/s40538-021-00211-0>

The Conjugates of Aminopenicillins with Proteins: Synthesis, Immunogenic Properties and Binding to a Beta-Lactam Receptor and Antibodies

O. S. Kuprienko*^{#,}, T. S. Serchenya*, I. I. Vashkevich*, I. V. Harbachova*,
 A. I. Zilberman*, and O. V. Sviridov*

[#]Phone: +375 (17) 395-92-75; e-mail: kuprienko@iboch.by

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
 ul. Acad. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

A new approach to the modification of aminopenicillins and the preparation of their conjugates with proteins using di-*N*-hydroxysuccinimide esters of dicarboxylic acids as cross-linkers has been proposed. Acylation of ampicillin (Amp) and amoxicillin (Amox) with di-*N*-hydroxysuccinimide esters of adipic or terephthalic acids was carried out in an organic solvent. Subsequent conjugation of the obtained aminopenicillin derivatives with proteins proceeded in an aqueous medium at pH 8.3, as a result of which immunogenic and enzymatic conjugates Amp and Amox were synthesized. It was shown that aminopenicillins retained the integrity of their beta-lactam cycle after chemical modification and under conditions of linker conjugates synthesis. In the course of long-term immunization of rabbits with the immunogenic conjugate of Amp with thyroglobulin containing an aromatic linker, polyclonal antibodies capable to bind Amp, Amox and penicillin G with very high sensitivity were obtained. The synthesized conjugates of Amp and Amox with horseradish peroxidase were characterized in a competitive protein-binding (receptor) assay, as well as in a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of the model immunoassay systems studied, the heterologous direct ELISA including the obtained polyclonal antibodies and the synthesized Amp peroxidase conjugate with an adipic acid fragment as a linker had the best characteristics: sensitivity to Amp 0.03 ng/mL, IC₅₀ = 0.20 ng/mL.

Keywords: penicillins, beta-lactam antibiotics, hapten-protein conjugates, receptor assay, enzyme-linked immunosorbent assay